

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



(19) **SU** (11) **1621720** (13) **A1**
(51) **6 G 01 N 33/52, A 61 K 49/00**

СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО СССР (ГОСПАТЕНТ СССР)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к авторскому свидетельству

1

2

(21) 4441045/14

(22) 29.04.88

(46) 09.07.95 Бюл. № 19

(71) Московский институт тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова; Московский научно-исследовательский онкологический институт; Институт радиотехники и электроники АН СССР

(72) Миронов А.Ф.; Румянцева В.Д.; Сапронова Е.В.; Чиссов В.И.; Сухин Г.М.; Пономарев Г.В.; Гайдук М.И.; Мененков В.Д.; Григорянц В.В.

(56) 1. Arger M.V., Wharen R.E., Anderson E.R. — J.Surg.oncol. 1983, v24, p.173-176.

(54) СПОСОБ ИССЛЕДОВАНИЯ МАЛИГНИЗАЦИИ ТКАНЕЙ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

(57) Изобретение относится к экспериментальной онкологии и может быть использовано для малиг-

низации тканей у экспериментальных животных. Цель изобретения — повышение точности исследования за счет увеличения коэффициента контрастности. Способ осуществляется путем введения животным с химически индуцированной опухолью люминесцентных соединений порфиринового ряда, облучения малигнизированных и нормальных тканей лазером, регистрации люминесценции и расчета коэффициента контрастности по отношению индекса люминесценции малигнизированных и нормальных тканей. При этом в качестве люминесцентных соединений используют иттербиевые комплексы водорастворимых порфиринов. Регистрацию люминесценции осуществляют в диапазоне 900 — 1050 нм. Способ позволяет повысить коэффициент контрастности до 10 — 48. 1 ил., 1 табл.

SU

1621720

A1

Изобретение относится к исследованию экспериментальной онкологии, а именно к малигнизации тканей у экспериментальных животных, и основано на способности некоторых порфиринов избирательно накапливаться в злокачественных клетках и затем люминесцировать при освещении светом определенной длины волны.

Цель изобретения – повышение точности исследования за счет увеличения коэффициента контрастности.

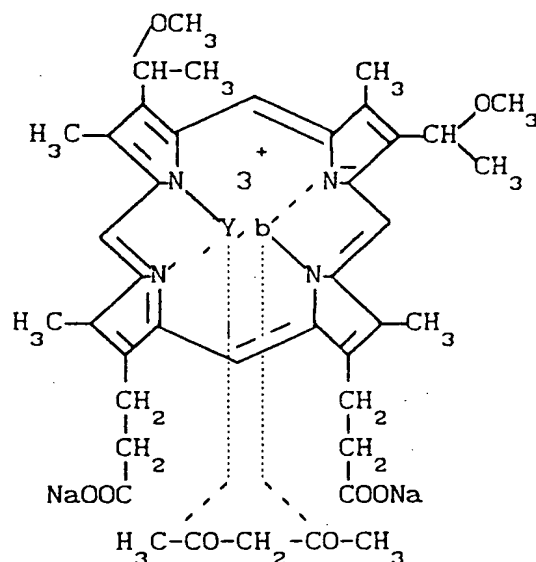
Способ осуществляют следующим образом. Экспериментальным животным с химически индуцированной опухолью вводят люминесцентные соединения порфиринового ряда, облучают лазером малигнизированные и нормальные ткани, регистрируют люминесценцию малигнизированных и нормальных тканей, а затем рассчитывают коэффициент контрастности по отношению индекса люминесценции малигнизированных и нормальных тканей.

Наблюдение люминесценции биологических объектов осуществляют в ближней ИК-области (900–1050 нм). В этой области практически отсутствуют фоновая люминесценция биообъектов. Измерение в ней возможно при введении иона иттербия в порфириновые и родственные им соединения, тропные к злокачественным опухолям.

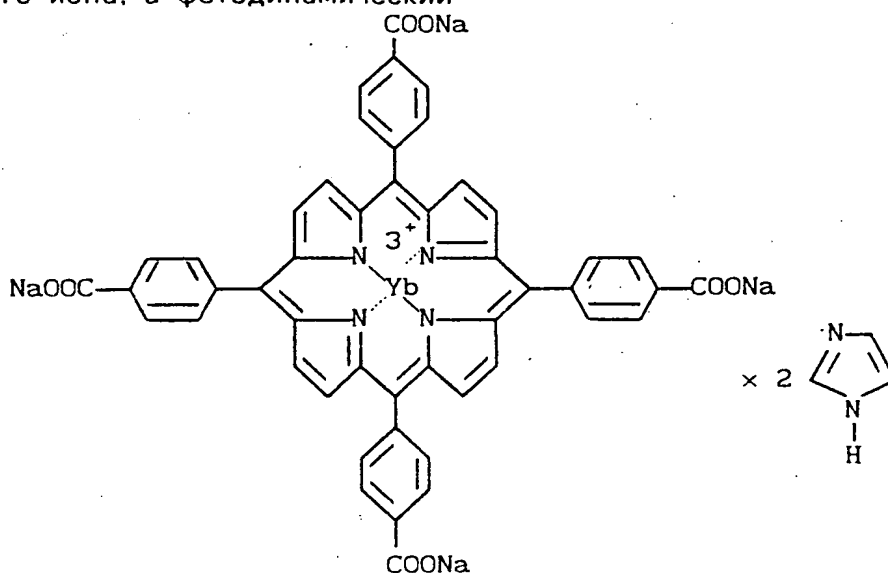
При этом вместо молекулярной люминесценции исходных порфиринов в видимом диапазоне спектра имеет место интенсивная и характерная для иона иттербия узколинейчатая люминесценция в упомянутом выше ИК-диапазоне, обусловленная переходами внутри 4f-конфигурации данного иона, а фотодинамический

эффект и обусловленная им фототоксичность резко подавляется. Коэффициент люминесцентного контраста у злокачественных тканей в предлагаемом способе исследования ограничивается лишь различием в концентрациях накапливаемых комплексов иттербия в злокачественной и окружающей здоровой тканях и уровнем шумов приемника излучения, используемого при регистрации спектров.

В качестве флуоресцентных зондов, тропных к клеткам опухоли, могут быть использованы иттербиевые комплексы трех типов водорастворимых порфиринов: Yb-комплекс 2,4-ди-(α -метоксиэтил)дейтеропорфирина – соединение I формулы

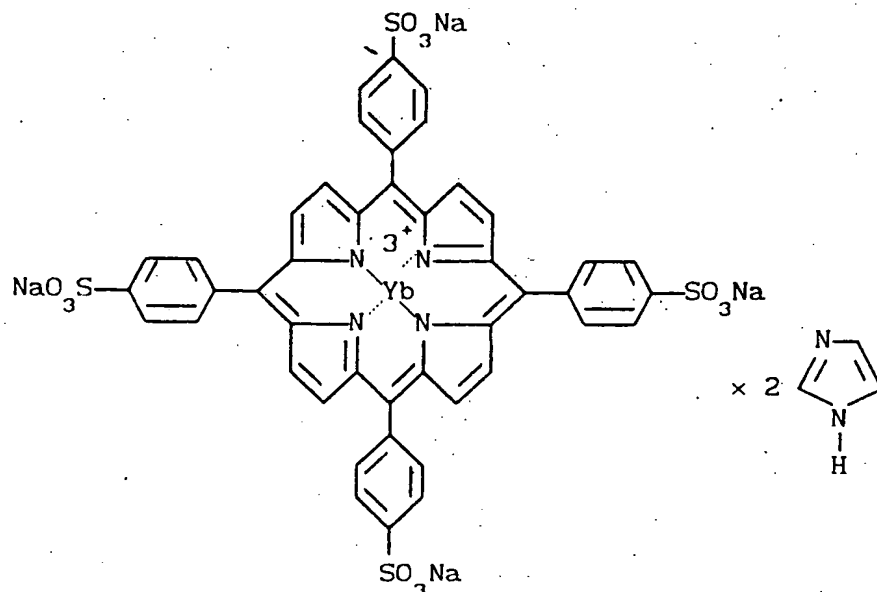


Yb-комплекс мезо-тетра-(п-карбокси-фенил)порфирина – соединение II формулы



и Yb-комплекс тетрасульфопенилпор-

фирина (ТСП) – соединение III формулы



При проведении биологических испытаний в виде ограниченной растворимости соединения I в воде его встраивали в 25 фосфатидилхолиновые липосомы.

Способ люминесцентного изучения клеток осуществлялся внутривенным введением соответствующего порфирина в физиологическом растворе или в виде водно-липосомальных дисперсий в хвостовую вену мышей C57Bl с подкожно развивающейся метилхоланттрениндуцированной саркомой. Затем через различные промежутки времени (от 3 до 48 ч) при нарастании числа злокачественных клеток осуществляли либо удаление опухоли с окружающими тканями, а также ряда других органов (печени, кожи, почек, сердца и т.д.) или непосредственно на самом животном под гексеналовым наркозом изучали люминесценцию опухоли и близлежащих тканей.

Люминесцентные характеристики биологических объектов получали методом волоконно-лазерной спектрофлуориметрии на базе двухволоконного лазерного интроскопа (ДВЛИ) с помощью лазера на АИГ:Nd на 2-й гармонике ($\lambda_{\text{ген}} = 532 \text{ нм}$) в качестве источника 1 накачки, изображенного на чертеже.

На чертеже изображены волоконные световоды 2 для передачи возбуждающего лазерного излучения и сбора полезного сигнала соответственно; микрообъектив 3 для фокусировки излучения лазера 4 на торец световода; оптическая система 5 для передачи полезного сигнала на входную щель монохроматора 6; фотозлектронный умножитель 7 с высоковольтным источником питания 8 и устройством 9 охлаждения. Регистрацию сигнала осуществляли с по-

мощью схемы синхронного детектирования, включающей модулятор 10, усилитель 11, цифровой вольтметр 12 и горизонтальный самописец 13. Оценку люминесцентного контраста γ проводили по площадям под кривыми люминесценции исследуемых объектов с помощью мини-ЭВМ (профессиональный компьютер типа HP).

Пример 1. Иттербиевый комплекс 2,4-дис-(α -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (I) встраивают в фосфатидилхолиновые липосомы следующим образом: 40 мг порфирина (I) растворяют в 5 мл хлороформа, добавляют 400 мг спиртового раствора фосфатидилхолина и упаривают на ротационном испарителе. Образующуюся пленку диспергируют в 4 мл 1%-ного раствора бикарбоната натрия или физиологического раствора и озвучивают на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДИ-2Т при 22 кГц в течение 7 мин при 0°C. Дисперсию центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин и супернатант используют в дальнейшем для изучения накопления в органах и тканях мышей. Липосомальный препарат вводят в хвостовую вену мышей в дозе 50 мг/кг веса. Затем через 27 ч проводят изучение люминесценции злокачественных клеток, близлежащей ткани мышей и ряда других органов методом волоконно-лазерной спектрофлуориметрии. Максимальный коэффициент контраста составляет 48 через 27 ч после введения препарата.

В таблице приведены полученные из спектра люминесценции значения S и S_0 для опухоли и нормальной ткани соответственно и вычисленное значение коэффициента γ .

Пример 2. Раствор иттербиевого комплекса мезо-тетра-(п-карбоксифенил)-порфирина (II) в 1%-ном растворе бикарбоната натрия или физиологического раствора в дозе 50 мг/кг веса вводят в хвостовую вену мышей. Через 6 ч проводят измерение люминесценции злокачественных и нормальных тканей. Максимальный коэффициент контраста γ составляет 10 через 6 ч после введения препарата (см.таблицу).

Пример 3. Раствор иттербиевого комплекса тетрасульфофенилпорфирина (III) в 1%-ном растворе бикарбоната натрия или физиологическом растворе в дозе 50

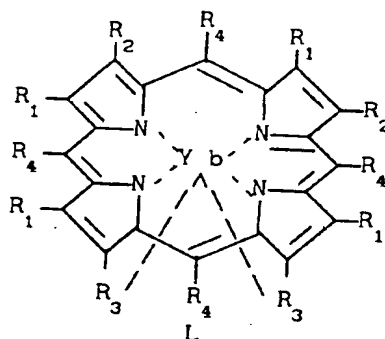
мг/кг веса вводят в хвостовую вену мышей. Через 3 ч снимают люминесцентные характеристики малигнизированной близлежащей здоровой ткани и других органов. Максимальный коэффициент контраста γ составляет 20 через 3 ч после введения препарата (см.таблицу).

Таким образом, приведенные в этих примерах значения коэффициента контраста γ наглядно подтверждают эффективность предложенного способа люминесцентной регистрации опухоли в сравнении с прототипом, где коэффициент контраста составляет 1,5-4,3.

Металлокомплекс порфирина	S, мм ²	S ₀ , мм ²	γ_s
Yb-комплекс 2,4-ди-(α -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (I)	2744	56	48
Yb-комплекс мезо-тетра-(п-карбоксифенил)порфирина (II)	4200	381	10
Yb-комплекс тетрасульфофенилпорфирина (III)	2813	138	20

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

СПОСОБ ИССЛЕДОВАНИЯ МАЛИГНИЗАЦИИ ТКАНЕЙ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ путем введения животным с химически индуцированной опухолью люминесцентных соединений порфирированного ряда, облучения лазером, регистрации люминесценции и расчета коэффициента контрастности, по отношению индекса люминесценции малигнизированных и нормальных тканей, отличающийся тем, что, с целью повышения точности исследования за счет увеличения коэффициента контрастности, в качестве люминесцентных соединений используют иттербиевые комплексы водорастворимых порфиринов: 2,4-ди(α -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (I), мезо-тетра-(п-карбоксифенил)порфирина (II) или тетрасульфофенилпорфирина (III) общей формулы



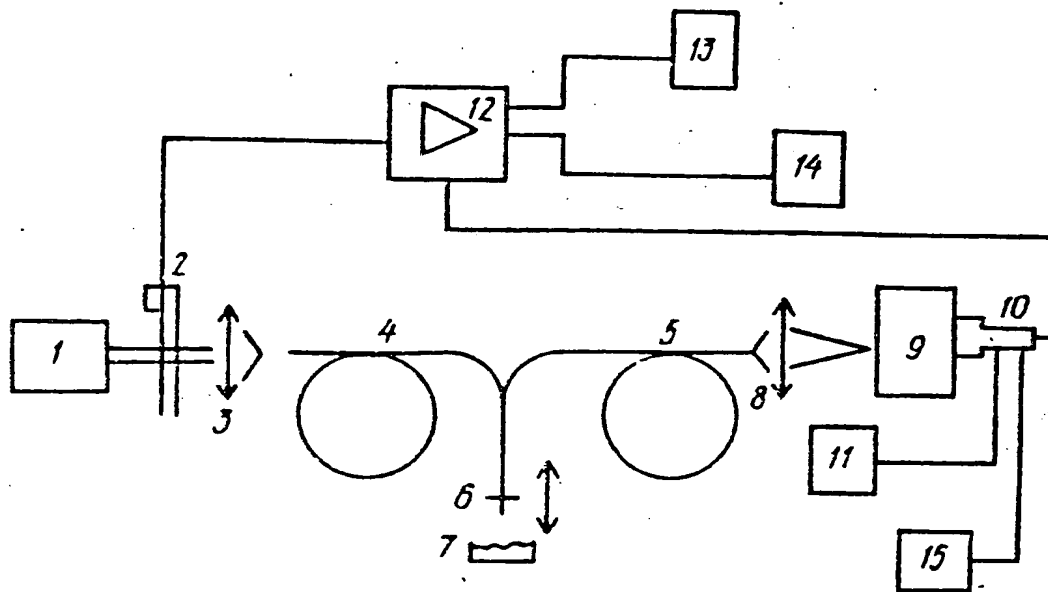
где $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}(\text{OCH}_3)\text{CH}_3$

$R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COONa}$, $R_4 = \text{H}$, L - аце- тилацетон;

$R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{C}_6\text{H}_4\text{COONa}$, L-имидазол ;

$R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$, L-имидазол .

а регистрацию люминесценции осуществляют в диапазоне 900 - 1050 нм.



Редактор М.Бокарева

Составитель Н.Гуляева
Техред М.Моргентал

Корректор О.Густи

Заказ 589

Тираж
НПО "Поиск" Роспатента
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Подписное